



TITLE:

Platforms of in vivo genome editing with inducible Cas9 for advanced cancer modeling(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Jo, Norihide

CITATION:

Jo, Norihide. Platforms of in vivo genome editing with inducible Cas9 for advanced cancer modeling. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21665>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	城 憲秀
論文題目	Platforms of <i>in vivo</i> genome editing with inducible <i>Cas9</i> for advanced cancer modeling (誘導型 <i>Cas9</i> による生体内ゲノム編集プラットフォームの構築とその発癌モデル応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>CRISPR/Cas9 は、ゲノム編集技術として急速な発展を遂げている。個体レベルでの応用も模索されており、例えば、受精卵や胚性幹（ES）細胞からノックアウト動物は容易に作製できるようになった。一方で、コンディショナルな生体内ゲノム編集に関して、CRISPR/Cas9 技術の応用例は未だ限定的である。ウイルスやエレクトロポレーション等を用いて体外から <i>Cas9</i> を導入する試みはあるが、低い遺伝子変異導入効率や変異体の不均質さから十分に普及するに至っていない。</p> <p><i>Cas9</i> トランスジェニック動物は、体外から <i>Cas9</i> を導入する障害を回避できるため、効率良く複雑な生体内ゲノム編集を可能とする。ドキシサイクリン誘導型 <i>Cas9</i> を用いた過去の報告（Dow et al. Nature Biotechnology 2014）では、複数 sgRNA を一緒にゲノムに組み込むことで、生殖系細胞系譜に寄与可能となり、高い遺伝子変異誘導効率を示すことができた。しかし、sgRNA の組み込みが制限酵素を基盤とした煩雑な方法であることや、薬剤誘導型システムの重大な注意事項である <i>Cas9</i> 発現リークによる非特異的ゲノム編集に関して十分に評価されていないこと、さらには例示された発がんモデルが遺伝子機能欠損の組み合わせのみで作成され、ヒト発がんにおける遺伝子変異の多様性を十分に反映したものではないこと等の問題点があった。</p> <p>本研究では、より利便性の高い生体内ゲノム編集技術の確立を目的として、新たなドキシサイクリン誘導型 <i>Cas9</i> によるプラットフォーム構築を試みた。<i>Rosa26</i> 遺伝子座に <i>rtTA</i>、<i>Colla1</i> 遺伝子座に <i>TRE-Cas9</i> と sgRNA を組み込んだ RC-プラットフォームと、<i>Rosa26</i> 遺伝子座に全てのコンポーネントを組み込んだ R-プラットフォームを作成した。Site-specific multi-segment cloning strategy を採用し、迅速かつ簡単に、複数 sgRNAs の組み込みを可能にした。</p> <p>RC-プラットフォームを ES 細胞に導入した場合、高い効率でゲノム編集が誘導可能であり、かつ <i>Cas9</i> 非誘導時のゲノム編集（リーク）は最小限に抑えられた。さらに、胎仔線維芽細胞（MEF）およびマウス生体へ応用することで、RC-プラットフォームが <i>in vitro/in vivo</i> における体細胞でも機能することを確認した。また生体内でのリークによる非特異的ゲノム編集に関して、<i>Apc</i> 遺伝子欠失による腸管腺腫モデルを用いて評価した。RC-プラットフォームでは、ドキシサイクリン非投与時には腺腫形成が認められず、少なくとも小腸・大腸上皮における非特異的ゲノム編集は最小限であることが示唆された。一方で、R-プラットフォームはドキシサイクリン反応性が乏しく、リークの程度も大きかった。</p>			

<p>最後に、複雑な遺伝子変異をもつ発がんを RC-プラットフォームを用いて再現できるか検証を行った。<i>Cttnb1</i> 遺伝子のエクソン 3 欠失による活性化型遺伝子変異と <i>Wt1</i> 遺伝子ノックアウトを胎生期に同時に誘導させることで、ウィルムス腫瘍モデルを作成することに成功した。さらに、13kb 以上にわたる <i>H19</i> 遺伝子座の欠失による <i>Igf2</i> 発現亢進と <i>Apc</i> 遺伝子欠損を同時に誘導することで、腸管腺腫の進展モデルが作成できた。</p> <p>本研究で構築されたプラットフォームは、従来まで複雑かつ多大な労力を要していた遺伝子改変疾患モデルの作成を簡便化し、腫瘍学を含めた様々な生物学研究分野における個体レベルでの実験に貢献することが期待される。</p>
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p><i>Cas9</i> トランスジェニック動物は、複雑な遺伝子改変を効率よく誘導できる可能性があるにも関わらず、そのポテンシャルは十分に理解されるに至っていない。本研究では、より利便性の高い生体内ゲノム編集技術の確立を目的として、新たなドキシサイクリン誘導型 <i>Cas9</i> プラットフォーム構築を試みた。Site-specific multi-segment cloning strategy を採用することにより、迅速かつ簡便に複数 sgRNAs の組み込みを可能とした。<i>Cas9</i> 非誘導時のゲノム編集（リーク）に関して、様々な細胞種、臓器、ターゲット遺伝子の組み合わせにより評価を行った。特に RC-プラットフォームは高い効率でゲノム編集が誘導可能であり、かつリークも最小限に抑えられていた。さらに、本研究におけるプラットフォームは、ウィルムス腫瘍や小腸腺腫進展という複雑な遺伝子変異を持つ発癌モデルに応用され、先進的発癌モデルとして提示することに成功した。</p> <p>以上の研究は、古典的な手法では極めて多大な時間と労力を要していた疾患モデル動物の作製を迅速・簡便化することに貢献し、様々な生物の個体レベルでの生命現象の解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>